

*A Szegedi Orvostudományi Egyetem Szemészeti Klinikájának
(igazgató: Süveges Ildikó egyetemi tanár) közleménye*

Megváltozott immunológiai reakciók degeneratio pigmentosa retinae

HAMMER HELGA, JOÓ IMRE, MOHAY JUDIT és RATKAY IMOLA

A degeneratio pigmentosa retinae (DPR) ismeretlen eredetű, rendszerint örökletes, ritkábban sporadikusan jelentkező retina disztrofia. A betegek immunológiai vizsgálata során több szerző észlelt autoimmun jelenségeket és egyéb immunológiai eltéréseket. Az eredmények azonban gyakran ellentmondóak, nem következetesek, és eddig még nem tisztázott, hogy az esetleges autoimmun folyamat melyik retina antigén ellen irányul. Ezért a jelen munkában a retina ultracentrifugálással elválasztott szubcelluláris membrán antigénjei ellen irányuló cellularis autoimmun reakciókat vizsgáltuk leukocita migrációs teszt segítségével DPR-ben szenvedő betegeknél. A betegek immunológiai reaktivitásának megítélésére meghatároztuk a keringő T-limfociták arányát, azok fitohemagglutinin reaktivitását, valamint a rövidéletű szuppresszor sejtek aktivitását.

Módszerek

Betegek. Vizsgálatainkat 18, klinikailag típusos DPR-ben szenvedő betegen végeztük. Kontrollként 9 immunológiailag egészséges hasonló korú személyt vizsgáltunk.

Antigének és mitogének. Fényhez adaptált szarvasmarha retinából 0,3 M szukrózban történő homogenizálás után ultracentrifugálással (Beckman L8 55 ultracentrifuga; szukróz gradiens; 75 000 g; 2 óra) 5 frakciót választottunk el [11].

Az egyes frakciók összetételére elektronmikroszkópos vizsgálat, marker-enzim vizsgálatok (Na^+ , K^+ -ATPáz, 5'-nukleotidáz, glukóz-6-foszfátáz, savanyú foszfátáz, monoamin oxidáz, béta glukozidáz, béta galaktozidáz) és rodopszin mérés eredményéből következtettünk. Az 1. retina frakció elsősorban fotoreceptor külső szegmenst (legnagyobb részt pálcikákat), a 2. frakció plazma membránt, a 3. frakció kisebb méretű mitokondriumokat, a 4. frakció nagyobb méretű mitokondriumokat, míg az 5. frakció endoplazmatikus retikulumot tartalmazott. Az uvea pigmentet [4] és az alfa krisztallint [6] a korábban leírt módon állítottuk elő.

Aspecifikus mitogénként DIFCO gyártmányú fitohemagglutinin M-et (PHA), a szuppresszor aktivitás méréséhez pedig SERVA gyártmányú concanavalin A-t (con A) használtunk.

Előzetes vizsgálatok eredménye alapján a migrációs teszthez az 1. frakciót 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fehérje, a 2. frakciót 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fehérje, a 3. frakciót 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fehérje, a 4. frakciót 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fehérje, az 5. frakciót 4,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fehérje, az alfa-kristallint 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fehérje, az uvea pigmentet pedig 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pigment koncentrációban alkalmaztuk. A transzformációs teszt során a tenyészeteket 1 : 100 hígítású PHA-val stimuláltuk, a szuppresszor aktivitás vizsgálatokor 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ con A-t alkalmaztunk.

Leukocita migrációs teszt [5]. Nátrium-citráttal alvadásgátló vérből ülepítéssel elválasztottuk a vörösvértest és a fehérvérsejt dús plazmát. A fehérvérsejt tartalmú plazmát centrifugáltuk (10 perc, 800 g, szobahőmérséklet), a sejteket PBS-ben (0,05 M pH 7,2 foszfát puffer, 0,1 M NaCl) mostuk, majd kapilláriscsőbe szívtuk. A cső egyik végét lezártuk, majd ismét centrifugáltuk, és végül a csövet a sejtréteg határára elvágtuk. A fehérvérsejt tartalmú kapilláris darabot szövettenyésztő edény aljára erősítettük, majd 24 órás tenyésztés után (Parker medium, 37 °C) a kivándorolt sejtek által fedett területet lemértük.

Az egyes antigének migrációt gátló hatását migrációs indexszel fejeztük ki, amely az antigén tartalmú és az antigén mentes, kontrollrendszerek migrációjának a hányadosa. Egy antigén hatását akkor tekintettük pozitívnak, ha a migrációs index 0,85-nél kisebb volt.

A limfocita transzformációs tesztet a korábban leírt módon végeztük [4]. $10^6/\text{ml}$ limfocitát tenyésztettünk 10% autológ és 10% AB Rh pozitív plazmát tartalmazó Parker 199

tápoldatban. Két napos tenyésztés után minden tenyészethez 1 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -timidint adtunk, és 24 óra múlva mértük a DNS-be beépült timidin mennyiségét. A PHA hatását a stimulált és a mitogént nem tartalmazó, kontroll tenyészetek beütésszámának különbségével fejeztük ki cpm/10⁶ limfocita ill. cpm/10⁶ T-limfocita egységekben.

A rövid életű szuppresszor sejtek aktivitását a Bresnihan és Jasín által leírt módon mértük [1]. A meghatározás elve az, hogy stimulálatlan limfocita tenyészetekben 24 óra alatt csak a szuppresszor hatású mononukleáris sejtek pusztulnak el.

A vizsgálat során minden személyből 4 féle tenyészetet készítettünk. Az elsőt a tenyésztés kezdetén 1 $\mu\text{g/ml}$ con A-val stimuláltuk, a második kontrollként szolgált (con A-t nem adtunk hozzá), a harmadikat 24 órás inkubálás (37 °C) után stimuláltuk 1 $\mu\text{g/ml}$ con A-val, a negyedik pedig ugyancsak kontrollként szolgált. A con A hozzáadását követően 2 nappal minden stimulált és megfelelő kontrolltenyészethez 1 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -timidint adtunk. További 24 órás tenyésztés után mértük a DNS-be beépült timidin mennyiségét.

A rövid életű szuppresszor sejtek aktivitását szuppresszor indexszel fejeztük ki, amely a 24 óráig előinkubált és a frissen stimulált tenyészetek beütésszámának a hányadosa.

A T-limfociták meghatározása a birka vörösvértestekkel történő spontán rozetta képzés (E-rozetta) alapján történt. Vizsgálatainkat Jondal által leírt módon végeztük, azzal a különbséggel, hogy nem 1 órás, hanem éjszakán át történő inkubálást alkalmaztunk [10].

Statistikai számítás. Az átlagértékeket t-próbával, a kóros értékek gyakoriságát χ^2 teszt segítségével hasonlítottuk össze.

Eredmények

A marhaszemből izolált antigének leukocita migrációt gátló hatását az I. táblázatban foglaltuk össze. A DPR-ben szenvedő betegek esetében a főleg pálcikákat tartalmazó I. retina frakció és az uvea pigment szignifikánsan alacsonyabb átlagos migrációs indexet eredményezett, és a 0,85-nél kisebb migrációs indexek is szignifikánsan gyakrabban fordultak elő, mint a kontrollocsoport-

I. táblázat

A retina antigének, az uvea pigment és az alfa-kristallin leukocita migrációt gátló hatása

Antigének	Átlagos migrációs index \pm SD		P	MI < 0,85 esetek gyakorisága		P
	DPR	Egészséges		DPR	Egészséges	
1. retinafrakció	0,86 \pm 0,16 n = 18	0,96 \pm 0,04 n = 9	< 0,06	8/18	0/9	< 0,05
2. retinafrakció	0,86 \pm 0,16 n = 18	0,96 \pm 0,10 n = 9	> 0,05	4/18	0/9	> 0,05
3. retinafrakció	0,86 \pm 0,17 n = 18	0,93 \pm 0,10 n = 9	> 0,05	5/18	1/9	> 0,05
4. retinafrakció	0,86 \pm 0,17 n = 17	0,89 \pm 0,10 n = 9	> 0,05	7/17	2/9	> 0,05
5. retinafrakció	0,83 \pm 0,19 n = 17	0,91 \pm 0,13 n = 9	> 0,05	10/17	3/9	> 0,05
Uvea pigment	0,86 \pm 0,12 n = 17	1,04 \pm 0,13 n = 5	< 0,01	7/17	0/5	< 0,05
Alfa-kristallin	0,92 \pm 0,09 n = 10	0,94 \pm 0,07 n = 5	> 0,05	1/10	0/5	> 0,05

ban. A 4. és 5. retinafrakció mind a DPR-ben szenvedőknél, mind pedig a kontrollcsoportban viszonylag gyakran okozott migráció gátlást, így a két csoport rögzített nem találtunk szignifikáns különbséget, míg a 3. retinafrakció és az alfa-krisztallin a két csoportban csak ritkán eredményezett 0,85-nél kisebb migrációs indexet.

Az E rozetta képző T-limfociták aránya DPR-ben szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontrollcsoportban. Ezzel szemben a PHA stimuláló hatása a két csoportban nem különbözött szignifikánsan, függetlenül attól, hogy a DNS-be történő timidin beépülést jelző beütésszámot 10^6 limfocitára vagy 10^6 T-sejtre vonatkoztattuk. A két csoportban a rövid életű szuppresszor sejtek aktivitása jelentős mértékben nem különbözött (II. táblázat).

II. táblázat
A T-sejtek aránya, azok fitohemagglutinin reaktivitása és a rövid életű szuppresszor-sejtek aktivitása degeneratio pigmentosa retinaeaban

	DPR	Egészségesek	P
T-sejt (%)	$69 \pm 3,2$ n = 14	$58 \pm 2,9$ n = 9	< 0,05
PHA stimuláció			
cpm/ 10^6 limfocita	$25\,400 \pm 5200$	$29\,600 \pm 6730$	> 0,05
cpm/ 10^6 T-sejt	$43\,700 \pm 8600$ n = 12	$42\,800 \pm 10\,200$ n = 9	> 0,05
Szuppresszor index	$3,2 \pm 0,7$ n = 9	$3,4 \pm 1,05$ n = 8	> 0,05

Megbeszélés

Vizsgálataink során az elsősorban pálcikákat tartalmazó 1. retina frakció, valamint az uvea pigment szignifikánsan gátolta a DPR-ben szenvedő betegek leukocita migrációját. Ez összhangban van azzal, hogy a betegség legjellemzőbb klinikai tünete a perifériás látás korai károsodása és a pigment destrukció. Természetesen ezeknek a vizsgálatoknak az eredményéből nem lehet eldönteni, hogy ezek a tünetek az autoimmun folyamat következtében alakultak-e ki, vagy a károsodott szövetek másodlagosan indukálták az immunreakciókat. Mivel a migráció gátlást csak a betegek egyrészénél lehetett megfigyelni mi valószínűbbnek tartjuk, hogy az autoszenzibilizáció másodlagos folyamat. Az autoimmunreakció azonban — függetlenül attól, hogy elsődleges vagy másodlagos — fokozhatja a fotoreceptorok és a pigmentepithel károsodását.

Vizsgálataink során a többi retina frakció és az alfa-krisztallin migrációt gátló hatása a két csoportban megegyezett. A 4. és 5. retina frakció mind DPR-ben, mind a kontrollcsoportban viszonylag gyakran okozott migráció gátlást. Ez arra utal, hogy ezek az antigének valószínűleg keresztreakciót adnak más szövetek mitokondriumaival és endoplazmás retikulumával. Ezekkel a gyakori és közös antigénnel szemben pedig könnyen alakulhat ki — elsősorban a károsodott szövetek eliminációjával kapcsolatban — nem-betegség-specifikus autoimmun reakció.

Számos szerző figyelt meg DPR-ben szenvedő betegeknél retina antigénnel szembeni immunreakciókat. Brinkman és mtsai [2], valamint Heredia és mtsai [8] a retina antigének (elsősorban a pálcikákat tartalmazó frakciók) limfocita stimuláló hatását észlelték. Char és mtsai pedig, célsejtként retino-

blasztoma sejteket alkalmazva, fokozott limfocita-citotoxicitást találtak [3]. Az S antigén azonban, amely a fotoreceptor rétegből származó szerv-specifikus protein, *Hendricks* és *Fishman* vizsgálatai szerint nem stimulálja a DPR-s betegek limfocitáit [7].

A DPR-ben szenvedő betegek celluláris immunreaktivitását is több laboratóriumban vizsgálták. *Heredia* és mtsai csökkent T-sejt számot, alacsonyabb PHA reaktivitást és szupresszor aktivitást találtak [8]. A közleményből nem derül ki, hogy az alacsonyabb PHA válasz a T-sejt szám csökkenésének vagy azok károsodásának a következménye-e. A T-sejtek funkcionális károsodására utal *Hooks* és mtsainak az a megfigyelése, hogy a DPR-s betegek egy részénél csökken az immuninterferon képzés [9]. *Hendricks* és *Fishman* monoklonális ellenanyagokkal végzett vizsgálatok során a helper sejtek csökkenéséből adódó alacsonyabb T-sejt számot talált, míg a B-sejtek aránya a normál tartományban volt [7].

Saját vizsgálataink során (*II. táblázat*) csak kismértékű T-limfocita arány csökkenést találtunk. DPR-ben a PHA stimuláló hatása alacsonyabb volt, mint a kontrollesoportban, ha a timidin beépülést 10^6 limfocitára vonatkoztattuk (a különbség nem szignifikáns). Ha azonban figyelembe vettük a T-sejt arány csökkenést a PHA reaktivitás a két csoportban teljesen megegyezett, és a rövid életű szupresszor sejtek aktivitása is azonosnak bizonyult. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy DPR-ben az immunológiai reaktivitás a különböző antigénekkal szembeni autoszenzibilizáció ellenére sem károsodott jelentősebb mértékben.

Összefoglalás

A szerzők 18 degeneratio pigmentosa retinae (DPR) szenvedő beteg és 9 immunológiailag egészséges személy esetében leukocita migrációs teszt segítségével vizsgálták a különböző retina antigénekkal, az uvea pigmenttel, valamint az alfa-krisztallinnal szembeni immunológiai reakciókat, továbbá a keringő T-limfociták arányát és azok reaktivitását. DPR-ben az elsőszobor pálcikákat tartalmazó retina frakció és az uvea pigment gátolta a leukocita migrációt, míg a többi retina antigén és az alfa-krisztallin nem okozott migráció gátlást. Betegeiknél a keringésben a T-limfociták aránya kismértékben csökkent, míg azok fitohemagglutinin reaktivitása és a szupresszor aktivitás normálisnak bizonyult.

IRODALOM: 1. *Bresnihan, B. and Jasin, H.*: J. Clin. Invest. 59, 106 (1977). — 2. *Brinkman, C. J. J., Pinckers, A. J. L. G. and Broekhuse, R. M.*: Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 19, 743 (1980). — 3. *Char, D. H., Bergsma, D. R., Rabson, A. S., Albert, D. M. and Herberman, R. B.*: Invest. Ophthalmol. 13, 198 (1974). — 4. *Hammer, H.*: Br. J. Ophthalmol. 55, 850 (1971). — 5. *Hammer, H.*: Br. J. Ophthalmol. 58, 773 (1974). — 6. *Hammer, H. and Oláh, M.*: Albrecht v. Graefes Arch. Ophthalmol. 192, 339 (1974). — 7. *Hendricks, L. and Fishman G. A.*: Arch. Ophthalmol. 103, 61 (1985). — 8. *Heredia, C. D., Vich, J. M., Huguet, J. Garcia-Caldeon, J. V. and Garcia-Calderon, P. A.*: Br. J. Ophthalmol. 65, 850 (1981). — 9. *Hooks, J. J., Barbara Detrick-Hooks, Shirley Geis and Newsome, D. A.*: Am. J. Ophthalmol. 96, 755 (1983). — 10. *Jondal, M., Holm, G. and Wigzell, H.*: J. exp. Med. 136, 207 (1972). — 11. *Zimmerman, W. F., Daemen, F. J. M. and Bonting, S. J.*: J. Biol. Chem. 251, 4700 (1976).

X. Хаммер, И. Йоо, Я. Мохаи, И. Раткаи: Измененные иммунологические реакции в пигментозно дегенерированной сетчатке

С помощью теста миграции лейкоцитов, у 18 больных с пигментозной дегенерацией сетчатки (DPR) и у 9 иммунологически здоровых лиц изучали иммунологические реакции против различных антигенов сетчатки, увеальных пигментов, а также альфа-кристаллина, кроме того, определяли пропорцию циркулирующих Т-лимфоцитов и их реактивность. При пигментной дегенерации сетчатки, в первую очередь, фракция

сетчатки, содержащая палочки, и увеальный пигмент ингибировали лейкоцитарную миграцию, тогда как прочие антигены сетчатки и альфа-кристаллин не вызывали торможения миграции. У наблюдаемых авторами больных пропорция циркулирующих в крови Т-лимфоцитов в небольшой степени уменьшилась, в то же время их реактивность к фитогемагглютинуину и супрессорная активность были нормальными.

Hammer H., Joó I., Mohay J., Ratkay I.: *Changed immunologic reactions in pigmentary retinopathy*

Immune reactions against different retina antigens, uveal pigment, and alpha-crystalline as well as the ratio of circulating T-lymphocytes and their reactivity were examined by leukocyte migration test in 18 patients with pigmentary retinopathy (PRP) and 9 persons without any immunological alteration served as control. In PRP cases mainly the retina fraction which contained the cones and uveal pigment inhibited the leukocyte migration while the other retina fractions and alpha-crystalline did not show any effect on migration. In the patients the ratio of T-lymphocytes decreased slightly in circulation, but their phytohaemagglutinin reactivity and suppression activity remained normal.

H. Hammer, I. Joó, J. Mohay, und I. Ratkay: *Geänderte immunologische Reaktionen bei Degeneratio pigmentosa retinae*

Bei 18 an Degeneration pigmentosa retinae (DPR) leidenden Patienten und bei 9 immunologisch gesunden Personen wurden mit Hilfe des Leukozyten-Migrationstests die immunologischen Reaktionen gegenüber Retina-Antigenen, dem Uveapigment sowie dem Alpha-Kristallin, ferner der Anteil der zirkulierenden T-Lymphozyten und ihre Reaktivität untersucht. Bei DPR waren für die Hemmung der Leukozytenmigration vor allem die Stäbchen enthaltende Retinafraktion und das Uveapigment verantwortlich, während die übrigen Retina-Antigene und das Alpha-Kristallin keine Migrationshemmung verursachten. Bei den Patienten hat sich der Anteil der zirkulierenden T-Lymphozyten in geringem Maße verringert, während sich ihre Phytohämagglutinin-Reaktivität und ihre Suppressor-Aktivität als normal erwiesen.